

The invented bacterium TG 26 is a *Bacillus subtilis* which has the function of efficient disease prevention and yield increasement for crops. During selecting strain, the stem, leaves, fruit, or ear epidermis of such plants as dicotyls (sponge gourd, soybean and tomato) and monocotyls (corn, rice, and wheat) and the soil in the range of 10 cm around their root are sampled. After boiling them at 75-100 deg.C, the *Bacillus* is selected, especially the strain featuring fast growing, strong anagocytic activity and broad antiseptic spectrum. Examine shows that the said TG 26 strain can secrete great deal of antiseptic protein, so having stronger anagocytic activity to the pathogenic bacteria and fungus for more plants. Through root immersing treatment, it can effectively prevent wilt of watermelon, green-wilt of tobacco and scab of wheat.

BEST AVAILABLE COPY



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 92112764.2

[51] Int.Cl⁵

A01N 63/04

[43] 公开日 1993 年 8 月 4 日

[22] 申请日 92.11.13

[71] 申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区北京大学红一楼
102 号

[72] 发明人 王雅平 刘伊强
潘乃斌 陈章良

[74] 专利代理机构 北京大学专利事务所
代理人 孙博宁

说明书页数: 10 附图页数: 1

[54] 发明名称 一种高效作物防病增产菌的选育与生产工艺

[57] 摘要

高效作物防病增产菌 TG26 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。菌种筛选工艺中, 采用从双子叶植物丝瓜、大豆、蕃茄, 单子叶植物玉米、水稻、小麦等根围 10cm 土壤、地上茎、叶片、果实或穗表皮取样。分离时首先经 75—100℃ 煮沸, 选取芽孢杆菌。选择生长快、抑菌活性强和抗菌谱广的菌株。经检测 TG26 菌株能分泌大量的抗菌蛋白, 其菌剂对多种植物病原真菌和细菌都有很强的抑菌活性。对目前已经测定的三种植物病害都有防治作用。浸根处理对西瓜枯萎病和烟草青枯病苗期防效都达 100%。对小麦赤霉病、西瓜枯萎病和烟草青枯病的田间防效分别为 76.4%、73.1% 和 79.6%, 并有明显的增产作用。

△10△

1. 本发明属于微生物领域中利用细菌及其产生的细菌素防治植物病害和促使作物产量增加的作物防病增产菌TG26及其选育与生产方法,其特征是:包括TG26菌株、分离筛选、原种扩繁、固体发酵和液体发酵工艺。

2. 权利要求1所述防病增产菌TG26菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),其主要特征为:

(1) 菌落在NDA平板上呈圆形,中间凸起,边缘整齐,表面皱褶,不透明,浅黄色,直径为0.55cm/24h;在NUB液体培养时有菌膜形成,细胞稳定。细胞为直杆状,0.7-0.8×2.0-2.4 μm,芽孢椭圆形近中生,孢囊不膨大,鞭毛周生,运动。原生质染色均匀。

(2) 好氧,在pH 5.7培养基上或7%的NaCl培养基中均生长,过氧化氢酶反应产气,甲基乙酰甲醇试验阳性,V.P培养液生长7天后pH为5.5,利用葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和甘露醇产酸,抗溶菌酶,不抗叠氮化钠,水解淀粉,利用柠檬酸盐,还原硝酸盐成亚硝酸盐,不利用丙酸盐,生长温度为8—50℃,最适生长温度为25—35℃; pH 4—9都能生长,最适pH为6.5—7.5。

(3) 能产生大量的有抑菌活性的胞外蛋白,几种纯化的抗菌蛋白的特征见说明书中表2。

3. 权利要求1所述防病增产菌TG26分离筛选方法的主要特征为:从双子叶植物丝瓜、大豆、蕃茄,单子叶植物玉米、水稻、小麦等根围10cm土壤、地上茎、叶片、果实或穗表皮取样,从样品中随机取5g/份,各取20份,每份加入50ml无菌水,于75—100℃煮沸5—30分钟,沉淀8—12小时,取上清稀释10⁸倍,涂布于已涂有浓度适中的病原指示菌的培养基上,培养24—48小时,挑取周围有无菌区的单菌落,从中选出菌落生长快、抑菌带宽、抗菌谱广的菌株。

4. 权利要求1所述原种扩繁的特点为：原种培养基配方：蛋白胨0.8—1.2%；葡萄糖0.4—0.8%；酵母膏0.4—0.8%；NaCl 0.4—0.8%；牛肉膏0.4—0.8%，以水补足体积；初始pH7.0—7.4；灭菌温度121—125℃，15—20分钟，接种量为1%；32—34℃培养24—36小时。

5. 权利要求1所述液体发酵工艺的特点为：接种量为1%，通气量为1:1 (V:V)，培养温度30—32℃，时间48—72小时；载体为轻质碳酸钙，乳化剂为十二烷基硫酸钠0.1%。

6. 权利要求1所述固体发酵工艺的特点为：培养基中含蛋白胨1.2—1.6%，葡萄糖0.8—1.2%，酵母提取物0.8—1.2%，NaCl 0.6—1.0%，牛肉膏0.8—1.2%，水15—20%，SDS 0.1%；调pH 7.0—7.4；以轻质碳酸钙补足体积；浅盘中经灭菌（121—125℃，30分钟）的培养料厚1.5—3.0cm，接种量5—7%，28—32℃开放培养48—72小时。

一种高效作物防病增产菌的选育与生产工艺

本发明涉及一种作物防病增产菌，枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) TG26菌株及其筛选和菌剂的生产方法。

在世界范围内，植物病害始终严重而普遍地给农业生产造成严重的损失。化学农药在防病增产过程中虽然起到了显著作用，但也造成了环境污染和人畜中毒等弊端。因此近年来世界各国对微生物农药的发展及应用引起了广泛的重视，并取得了较好的成效。在拮抗菌利用方面以防虫为多 (Hall, I. M., 1963, Fast, P. G., 1978-1981)，在防病利用上又以真菌居多 (Macfarlane, G., 1984, Boland, G. J. 1990)。目前世界上利用细菌及细菌素防治植物病害最成功的是用农杆菌 K84 (Kerr, A. 1980) 防治多种蔬菜、果树的根癌病，在澳大利亚已经商品化，在欧美有一定的推广面积。在作物增产菌方面，陈延熙 (1984) 提出了“植物体自然生态系”理论，Pekkema & Schippers (1986) 和 Inglis & Boland (1990) 也提出了相似的理论。陈延熙等1990年根据上述理论从作物体中分离出了地衣芽孢杆菌 (*Bacillus Licheniformis*) 和蜡质芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 并以多种菌株组合群体发展成具有保健作用的增产菌剂。

本发明的目的在于以植物生态学原理为基础，从根际土壤或植物组织上分离得到产细菌素的植物活性菌；并提供这种对植物病害有防治作用和对植物生长有促进作用的生物活性菌剂的生产方法。因此，本发明着眼点在于筛选对多种植物病原菌有抑菌活性并且可使作物增产的拮抗菌株，使其能防治多种病害，又有增产作用，在多效性及广谱性上优于目前的微生物农药制剂。经过大量筛选工作从丝瓜根部分离纯化出了枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) TG26菌株。

本发明的技术方案概况为以下具体步骤:

1. TG26 菌株的分离纯化

从双子叶植物丝瓜、大豆、蕃茄、单子叶植物玉米、水稻、小麦等根围10cm土壤、地上茎、叶片、果实或穗表皮取样。从样品中随机取5g/份,各取20份。每份加入50ml无菌水,于75—100℃煮沸5—30分钟,沉淀8—12小时后,取上清液10°倍,涂布于已涂有浓度适中的病原指示菌的培养基上,培养24—48小时,挑取周围有无菌区的单菌落。对初筛出的单菌落进一步分离纯化,并测定对各种植物病原菌的抑菌活性。从中选出菌落生长快、抑菌带宽、抗菌谱广的菌株。所选出的具有高效抑菌活性TG26菌株的抑菌活性及病原指示菌见表1。该菌株是从丝瓜根部土壤中分离得到的。

2. TG26菌株的鉴定

TG26菌株的群体特征:菌落在NDA平板上呈圆形,中间凸起,边缘整齐,表面皱褶,不透明,浅黄色。菌落直径为0.55cm/24h;在NDB液体培养基中静止培养时有菌膜形成,细胞稳定。

个体形态:细胞为直杆状,0.7-0.8×2.0-2.4μm,芽孢椭圆形近中生,孢囊不膨大,鞭毛周生,运动,原生质染色均匀。

理化特性:好氧,在pH5.7培养基上或7%的NaCl培养基中均生长。过氧化氢酶反应产气,甲基乙酰甲醇试验阳性,V.P培养液生长7天后pH为5.5。利用葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和甘露醇产酸。抗溶菌酶,不抗叠氮化钠,水解淀粉,利用柠檬酸盐,还原硝酸盐成亚硝酸盐,不利用丙酸盐。生长温度为8—50℃,最适生长温度为25—35℃; pH4—9都能生长,最适pH为6.5—7.5。

能产生大量有抑菌活性的胞外蛋白,几种抗菌蛋白经Sephadex-G150和FPLC的MonoQ柱已经纯化出来,其氨基酸组成见表2。

根据上述特征特性,该菌属于第八版“伯杰氏鉴定细菌学手册”中的芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。该菌株已送CGMCC保存,保存号N 0182。

3. TG26 菌剂的生产工艺

将分离得到的TG26菌株按下述程序进行培养：见附图1。

上述原种培养基配方为：蛋白胨0.8—1.2%；葡萄糖0.4—0.8%；酵母膏0.4—0.8%；NaCl 0.4—0.8%；牛肉膏0.4—0.8%；以水补足体积；调初始pH7.0—7.4。

固体培养基加1.6—2.0%的琼脂。

(1) 原种的培养

将配好的液体培养基以1/3容量盛装三角瓶，于121—125℃下灭菌20—30分钟，冷却后以1%的接种量接种。32—34℃培养24—36小时，做为原种。

(2) 液体发酵

于发酵罐中盛2/3体积的液体培养基，灭菌（121—125℃，20—30分钟），冷却后以1%的接种量接种，通气量为1:1（V:V），30—32℃培养48—72小时，然后放罐混入轻质碳酸钙和0.1%的十二烷基硫酸钠（SDS）为乳化剂，喷雾干燥成可湿性粉剂，或直接包装即成产品。

(3) 固体浅盘培养

培养基：蛋白胨1.2—1.6%，葡萄糖0.3—1.2%，酵母提取物0.3—1.2%，NaCl 0.6—1.0%，牛肉膏0.8—1.2%，水15—20%，SDS 0.1%；调pH7.0—7.4，其余为轻质碳酸钙（160—200目）。

将培养料混匀后于121℃下灭菌30—40分钟，铺入浅盘，厚1.5—3.0cm，接5—7%的原菌剂，拌匀，开放培养48—72小时，干燥后过筛包装成粉剂。含活细胞数大于100亿/g。

4. TG26 菌剂的使用方法

(1) 拌种：液体菌剂40—50ml/亩或固体粉剂10—15g/亩，加入适量水拌入种子，稍干后播种。

(2) 浸种：适用于需发芽播种的作物，发好芽的种子，播种前

用液体菌剂40—50ml/亩或固体粉剂10—15g/亩，加适量的水浸种40—50分钟后播种。

(3) 浸根：适用于移栽作物前施用，在作物移栽前用菌剂50—60ml/亩或固体粉剂15—20g/亩，加适量水浸根40—50分钟后移栽。

(4) 灌根：在作物生长期易感病害前用液体菌剂50—60ml/亩或固体粉剂15—20g/亩，加适量水灌根。

(5) 喷雾：在作物生长期易感病害前，用液体菌剂30—50ml/亩或固体粉剂10—15g/亩，加适量水均匀喷到植株上。

目的为了防治植物根部病害或以单纯性增产为主要目的，应以浸种（拌种）、浸根和灌根的方法施用；如以防治植物地上部分病害应以喷雾施用效果为佳；也可两种以上方法配合使用。

5. TG26 菌剂防病增产效果

对目前已经测试的小麦赤霉病、西瓜枯萎病和烟草青枯病都有良好的防病增产效果。实施实例中菌剂培养如前所述。

实施实例1. 小麦赤霉病

在感病程度不同的小麦品种开花前三天喷雾TG26菌剂，表现出很好的防病效果，病小穗数及防效见表3。在江苏小麦赤霉病常发区的防效为76.4%，并有明显的增产作用。

实施实例2. 西瓜枯萎病

浸种处理对西瓜枯萎病苗期防效为100%，成株期防效83.3—93.3%，田间灌根防效为73.1%，增产65.5%。

实施实例3. 烟草青枯病

浸根处理对烟草青枯病苗期防效为100%，田间成株期灌根防效79.6%，增产60.2%。

实施实例4. 单纯性增产实验

灌根处理使烟草根长增加49.23%，叶干重增加22.92%，其相关

指标也明显增加（见表4）。

6. TG26菌株防病增产性机制及优点

防病增产性机制的初步研究表明，TG26菌株分泌的抗菌蛋白对植物病原真菌的分生孢子及细菌细胞有溶解作用，对病原菌的生长有抑制作用。施入土壤后，能增加土壤中速效磷的含量，促进植物吸收土壤中的氮，使植物与土壤之间的良性循环性增强。没有污染和残毒，不影响生态环境，只是在作物生长的短期内，于局部位置上形成优势，发挥其积极作用。时间一延长，作物生长发育后施入的菌剂量就又很快恢复到使用前水平。

同时该菌剂还具有适用于大规模生产，有效菌株单纯，工艺简便，成本低廉，每亩地成本只需几角钱。使用方便，一般可以结合常规田间管理措施进行使用。

附图说明：

图1 菌剂的生产工艺图

表1 拮抗菌TG26及其粗蛋白的抗菌谱

病原菌	抗菌活性	
	菌落	粗蛋白
小麦赤霉病菌 (<i>Gibberella zeae</i>)		
JF ₃ (SV)	+++	+++
F ₁₆ (SV)	+++	+++
F ₁₇ (SV)	+++	+++
F ₄ (SV)	++	++
F ₁₀ (SV)	++	++
F ₃₄ (SV)	+++	+++
F ₂₃ (SV)	++++	++++
F ₆₂ (SV)	++++	+++
H ₂₈ (MV)	+++	+++
H ₂₀ (SV)	++++	+++
水稻稻瘟病菌 (<i>Piricularia oryzae</i>)		
91-78-1 (SV)	+++++	++++
91-3-1 (SV)	++++	++++
2h2-1 (MV)	+++++	++++
玉米小斑病菌 (<i>Helminthosporium maydis</i>)		
T (SV)	+++++	++++
O (SV)	+++++	++++
玉米大斑病菌 (<i>Helminthosporium turcicum</i>)		
No 1 (SV)	+	+

棉花枯萎病菌		
<i>(Fusarium oxysporum f. vasinfectum)</i> (SV)		
	+++	+++
西瓜枯萎病菌		
<i>(Fusarium oxysporum f. niveum)</i> (SV)		
	++	++
蕃茄枯萎病菌		
<i>(Fusarium oxysporum f. lycopersici)</i> (SV)		
	+++	+++
小麦纹枯病菌		
<i>(Rhizoctonia cerealis)</i> (SV)		
	+++	+++
烟草赤星病菌		
<i>(Alternaria longipes)</i>		
3.1015 (SV)	++++	++++
3.4225 (SV)	++++	++++
人参锈腐病菌		
<i>(Ranzularia panacicola)</i> (SV)		
	++++	++++
水稻白叶枯病菌		
<i>(Xanthomonas campestris)</i>		
pv. <i>oxyzae</i> X61 (SV)	+++	+++
烟草青枯病菌		
<i>(Pseudomonas solanacearum)</i>		
T62P (SV)	+++++	++++
T62 (MV)	+++++	++++
T64 (WV)	+++++	++++

“+”：抑菌圈直径 (mm)，+：10.0—15.0；++：15.1—20.1；
+++：20.1—25.1；++++：25.1—30.1；+++++：>30.1

表2. 几种抗菌蛋白的氨基酸组成*

Amino acid	Pure protein BI		Pure protein BII		Pure protein BIII	
	Content (mol%)	No. of residues	Content (mol%)	No. of residues	Content (mol%)	No. of residues
Aspartic acid	1.81	2.43	15.00	18.60	9.15	5.56
Threonine	7.91	10.61	2.70	3.40	6.14	3.75
Serine	0.41	0.56	5.10	6.50	12.32	7.55
Glutamic acid	34.70	46.57	17.30	21.50	7.86	4.89
Proline	11.06	14.84	2.00	1.60	1.86	1.14
Glycine	0.74	1.00	0.00	0.00	8.85	5.46
Alanine	7.03	9.43	1.20	1.50	4.71	2.88
Valine	3.13	4.21	9.10	11.30	7.23	4.76
Methionine	0.42	0.52	0.00	0.00	2.20	1.41
Isoleucine	8.78	11.76	2.30	2.80	5.52	3.37
Leucine	4.34	5.63	39.90	49.50	21.04	12.84
Tyrosine	18.73	25.14	5.30	6.50	3.71	2.27
Phenylalanine	0.00	0.00	0.00	0.00	2.45	1.50
Lysine	0.64	0.86	0.40	0.50	2.65	1.62
Histidine	0.00	0.00	0.00	0.00	1.84	1.00
Arginine	0.00	0.00	0.00	0.00	1.59	1.21
Cysteine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

* 根据氨基酸组成计算的分子量: BI 为13970; BII 为14497;

BIII 为15345。

表 3. TG26 菌剂在不同小麦品种上对赤霉病的防治效果

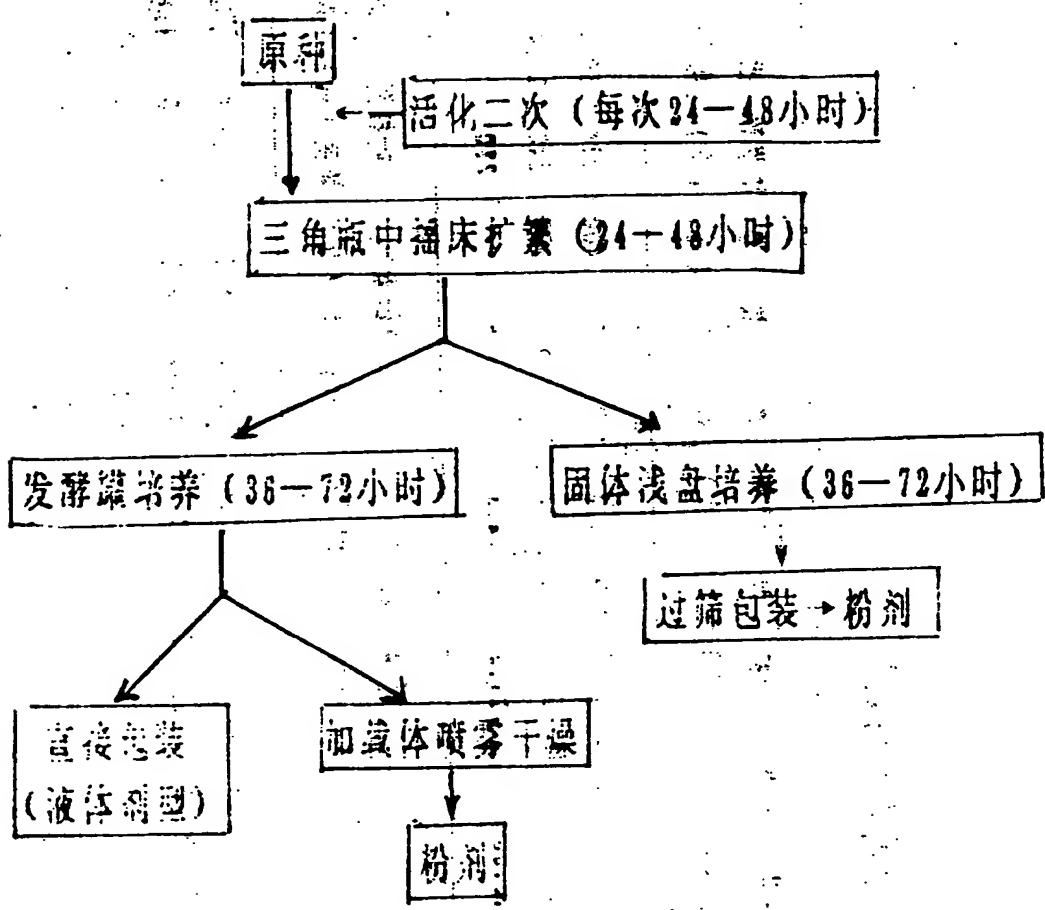
品种	抗感性	病小穗数 (个)			防效 (%)	
		CK	接种前处理	接种后处理	接种前处理	接种后处理
荆州1号	NR	2.16	0.66	1.00	69.40	53.70
新中长	NR	3.13	0.71	1.11	74.00	64.50
扬麦5号	MS	3.25	0.78	1.11	78.00	65.80
镇7485	MS	4.00	0.88	1.77	78.43	55.75
Alondra 'S'	S	4.96	0.88	1.86	82.25	62.50
Anhui 11	S	6.00	0.81	2.40	86.40	60.00
894037	S	4.87	0.55	1.83	88.70	62.40
宁麦6号	S	7.78	0.79	1.96	89.80	65.80

表4. TG26 菌剂在烟草上的增产指标

处 理 (cfu/g)	株高 (cm)	增 茎粗 (%) (cm)	增 根长 (%) (cm)	增 叶数 (%) (个)	增 叶芽 (%) (个)	增 花数 (%) (个)	增 花蕾数 (%) (个)							
5.0×10^5	60.8	5.37	1.18	1.50	23.13	49.23	22.0	1.0	5.3	1.0	25	400	374	30.4
2.5×10^6	53.7	-	1.18	1.50	17.58	13.42	21.3	0.0	5.3	1.0	15	200	346	23.4
CK	57.7		1.17		15.50		21.3		4.3		5		280	

处 理 (cfu/g)	鲜重 (g)	根 增 (%)	叶 增 (%)	干重 (g)	根 增 (%)	叶 增 (%)	OD值	叶绿素 增 (%)	叶打孔 鲜重 (mg)			
5.0×10^5	12.4	20.4	28.30	27.12	5.20	18.2	5.90	22.92	0.114	6.5	68.8	5.8
2.5×10^6	11.8	14.6	26.50	14.57	5.10	15.91	5.31	11.04	0.114	6.5	67.0	3.1
CK	10.3		23.05		4.40		4.80		0.107		65.0	

• 该表数据为20株平均值。



附图 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.